

III. METODE PENELITIAN

3.1 Waktu dan Tempat

Penelitian ini telah dilakukan di Laboratorium Bioteknologi Universitas Muhammadiyah Malang. Waktu penelitian dilaksanakan selama \pm 4 bulan dari bulan Oktober 2016 – Januari 2017.

3.2 Alat dan bahan

Alat yang digunakan antara lain, (1) alat untuk pembuatan media yaitu alat-alat gelas (beaker glass, pipet ukur, pipet tetes, gelas ukur, corong kaca, spatula), pH meter, microwave, botol kultur, aluminium foil, plastik, karet, tisu, kertas label, masker, karet hisap, agar dispenser, timbangan analitik, freezer, dan autoklaf (2) alat untuk penanaman planlet kentang yaitu LAF (Laminar Air Flow), dissecting set (pinset, scalpel, gunting), bunsen burner, hand sprayer, dan warping plastik. (3) alat untuk pengamatan yaitu penggaris, kertas millimeter blok, timbangan analitik, dan alat tulis.

Bahan yang digunakan yakni planlet kentang (*Solanum tuberosum* L.) varietas Madisu AP4 dan varietas Granola kembang, alkohol 70 % dan 96 %, stok media MS, zat pengatur tumbuh BAP dan NAA, spiritus, aquades steril, aquades, sukrosa dan agar-agar.

3.3 Rancangan Percobaan

Penelitian ini akan menggunakan splitplot yang disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan 10 kombinasi perlakuan dan diulang sebanyak 3 kali. Perlakuan yang akan diuji adalah sebagai berikut:

Petak utama : Varietas Kentang (V)

V1 : Varietas Madisu AP4

V2 : Varietas Granola Kembang

Anak petak : Konsentrasi ZPT (B)

B0 : Tanpa BAP

B1 : 1 ppm BAP

B2 : 2 ppm BAP

B3 : 3 ppm BAP

B4 : 4 ppm BAP

Adapun kombinasi perlakuan seperti disajikan pada Tabel 1. Adalah sebagai berikut:

Tabel 1. Kombinasi Perlakuan konsentrasi ZPT dengan Varietas Kentang

B/V	V1	V2
B0	V1B0	V2B0
B1	V1B1	V2B1
B2	V1B2	V2B2
B3	V1B3	V2B3
B4	V1B4	V2B4

Keterangan : V1B0 : Madisu AP4 + Kontrol

V1B1 : Madisu AP4 + BAP 1 mg/l

V1B2 : Madisu AP4 + BAP 2 mg/l

V1B3 : Madisu AP4 + BAP 3 mg/l

V1B4 : Madisu AP4 + BAP 4 mg/l

V2B0 : Granola Kembang + Kontrol

V2B1 : Granola Kembang + BAP 1 mg/l

V2B2 : Granola Kembang + BAP 2 mg/l

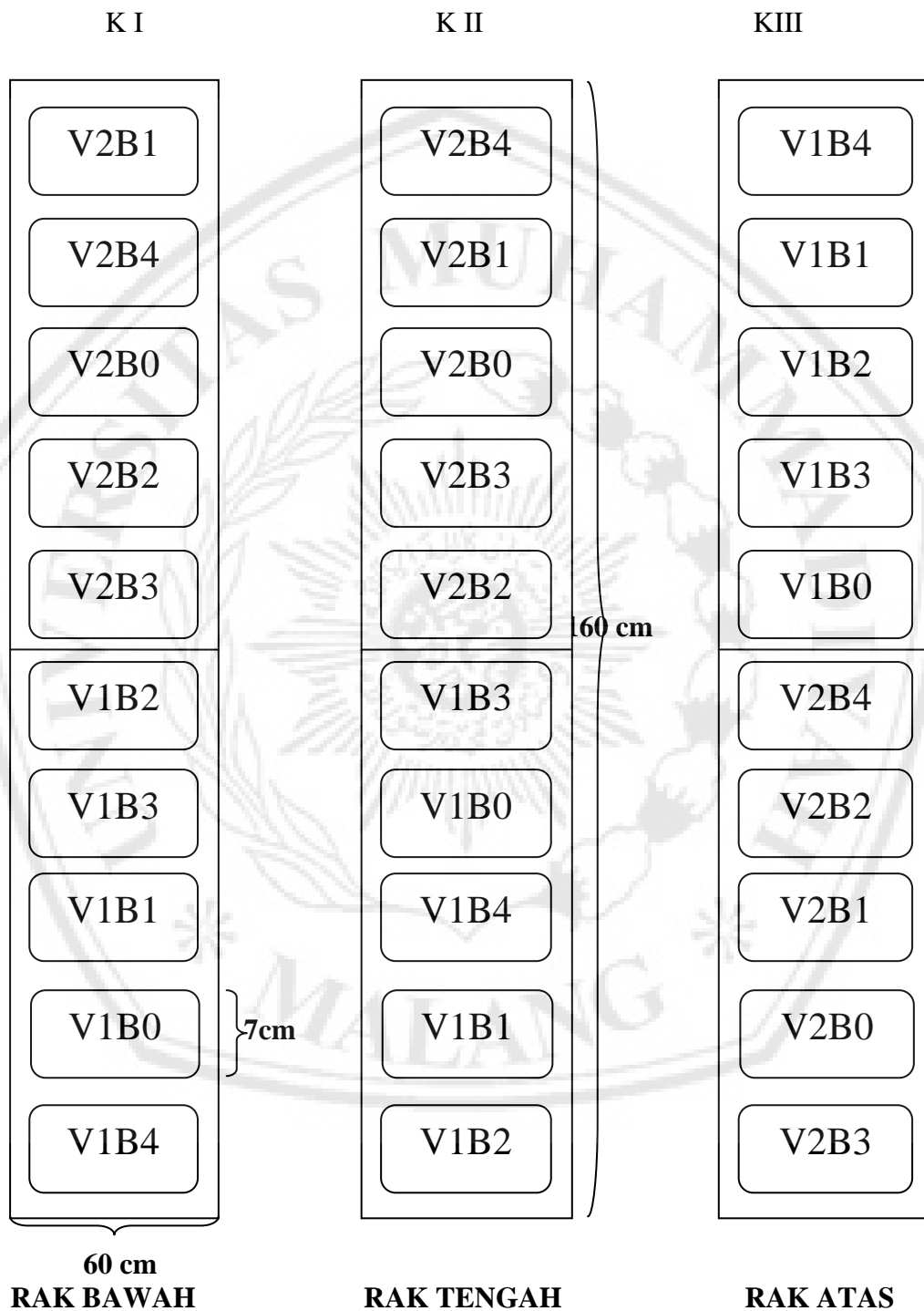
V2B3 : Granola Kembang + BAP 3 mg/l

V2B4 : Granola Kembang + BAP 4 mg/l

3.4 Denah Penelitian

Adapun denah tata letak penelitian di laboratorium disajikan pada Gambar

2. Sebagai berikut :



Gambar 2. Denah Tata Letak Penelitian

Keterangan :

B0 : Tanpa BAP

K I, K II, K III : Kelompok

B1 : BAP 1 mg/l

V1 : Varietas Madisu AP4

B2 : BAP 2 mg/l

V2 : Varietas Granola Kembang

B3 : BAP 3 mg/l

B4 : BAP 4 mg/l

3.5 Pelaksanaan Penelitian

3.5.1 Persiapan dan Sterilisasi Alat

Proses persiapan dan sterilisasi yang akan dilakukan yakni sebagai berikut:

1. Mempersiapkan semua alat yang akan disteril meliputi, cawan petri, alat diseksi (pinset, scalpel, gunting) dan botol kultur
2. Sterilisasi cawan petri dan alat diseksi dilakukan dengan melapisi cawan petri alat diseksi dengan kertas dan dimasukkan ke dalam plastik, sedangkan botol kultur di tutup menggunakan plastik dan diikat dengan karet
3. Memasukan semua alat yang akan disterilisasi ke dalam autoklaf
4. Sterilisasi alat dilakukan dengan suhu 121°C selama 60 menit

3.5.2 Pembuatan Media

Adapun proses pembuatan media kultur yang akan dilakukan yakni sebagai berikut:

1. Menyiapkan dan mensterilisasi peralatan yang akan digunakan untuk pembuatan media.
2. Menimbang agar-agar sebanyak 6,3 g untuk 0,9 l media sebanyak 5 kali dan sukrosa sebanyak 135 gr untuk 4,5 l media MS.

3. Mempersiapkan stok media MS dan mengambil stok media dengan menggunakan pipet ukur ke dalam breaker glass untuk pembuatan media MS sebanyak 4,5 l.
5. Menambahkan aquades sampai volumenya 0,5 l dan memanaskan media selama 2 menit dengan microwave.
6. Menambahkan sukrosa yang telah ditimbang sesuai dengan kebutuhan ke dalam media dan mengaduk media sampai homogen.
7. Menambahkan aquades hingga volumenya 1 l.
8. Membagi media menjadi 5 bagian atau kelompok, masing-masing bagian sebanyak 0,2 l media MS.
9. Menambahkan ZPT sesuai dengan konsentrasi yang akan diuji pada setiap media yang telah dibagi dan menambahkan aquades pada setiap bagian sampai volumenya 0,9 l.
10. Mengukur pH media dengan pH meter. pH optimal untuk pembuatan media adalah 5,6 – 5,8
11. Menambahkan NaOH tetes pertetes jika pH media terlalu asam dan menambahkan HCl jika pH media terlalu basa sambil diaduk terus menerus agar larutan menjadi homogen dan tepat pengukuran pH-nya
12. Menambahkan agar-agar yang telah ditimbang jika pH media telah mencapai 5,6 – 5,8
13. Memanaskan media sampai mendidih merata.
14. Memasukkan media ke dalam botol kultur yang telah disterilisasi dengan menggunakan agar dispenser. Tiap botol berisi 0,03 l media.

15. Menutup botol dengan plastik yang telah disterilisasi dan diikat dengan karet gelang.

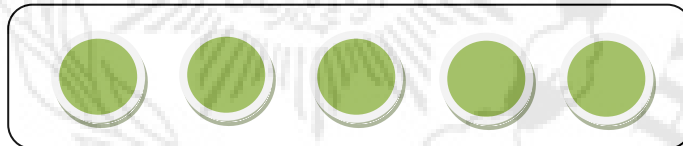
3.5.3 Sterilisasi Media

Proses sterilisasi media kultur yang akan dilakukan yakni sebagai berikut:

1. Memasukkan botol kultur yang telah terisi media ke dalam autoklaf
2. Mensteril media dengan suhu 121°C selama 10 menit
3. Mengambil media dalam autoklaf dan mendinginkannya sampai media benar-benar dingin kemudian memasukkan media ke dalam ruang kultur
4. Mendinginkan media 4 – 5 hari untuk mengetahui kontaminasi dari media kultur tersebut.

3.5.4 Penanaman Planlet Kentang

Tata letak tanam planlet tanaman kentang dalam rak disajikan pada gambar 3. Sebagai berikut:



Gambar 3. Tata letak Tanam Planlet

Keterangan :  : Sampel yang diamati

Proses Penanaman planlet kentang yang akan dilakukan yakni sebagai berikut:

1. Mempersiapkan alat yang akan digunakan meliputi cawan petri, alat diseksi (pinset, scalpel, gunting), alkohol 96 % untuk steril alat diseksi dan Bunsen burner

2. Menyalakan lampu UV selama 1 jam
3. Memasukkan media kultur dan planlet kentang, penanaman dilakukan selang satu hari tiap kelompoknya. Planlet kentang yang digunakan adalah planlet kentang yang bebas dari kontaminan.
5. Merendam alat diseksi ke dalam alkohol 96 % dan membakar alat tersebut sebelum digunakan
6. Mengeluarkan planlet kentang dalam botol dan memotong planlet kentang maksimal 2 ruas batang planlet kemudian menanamnya ke dalam media.
7. Satu botol media berisi 3 eksplan.
8. Menutup kembali botol dan mewarping botol untuk meminimalisir kontaminasi.

Dalam penelitian ini dilakukan 2 tahap penanaman yaitu sebagai berikut:

3.5.5 Inkubasi

Inkubasi dilakukan di ruang kultur dengan kondisi ruangan yang steril dengan suhu dan cahaya terkontrol. Dalam tahap ini botol kultur yang telah ditanami disimpan di rak kultur dengan suhu $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ dengan pencahayaan lampu 2500-3000 Lux selama 16 jam penyinaran. Inkubasi dilakukan selama 4 minggu setelah tanam.

3.5.6 Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan terdiri dari pengamatan pertumbuhan tunas kentang saat inkubasi. Berikut ini adalah deskripsi variabel pengamatan yang diamati dalam penelitian ini, yakni:

3.5.6.1 Pengamatan Pertumbuhan Tunas Kentang

1. Saat munculnya tunas pertama, dihitung pada hari seberapa mulai muncul tunas baru yang pertama kali, baik tunas apical maupun tunas lateral pada 3 sampel eksplan setelah tanam. Pengamatan dilakukan setiap hari sampai muncul tunas pertama kali.
2. Saat munculnya akar pertama, dihitung pada hari seberapa saat akar pertama kali muncul pada 3 sampel eksplan setelah tanam. Pengamatan dilakukan Pengamatan dilakukan setiap hari sampai muncul akar pertama kali.
3. Jumlah Tunas, dihitung berapa banyak tunas baru yang muncul pada 3 sampel eksplan dengan interval pengamatan tiap 3 hari sekali selama 6 minggu pengamatan.
4. Jumlah akar, dihitung berapa banyak akar yang muncul pada 3 sampel eksplan yang ditanam tiap botol dengan interval pengamatan tiap 3 hari sekali selama 6 minggu pengamatan.
5. Panjang tunas, diukur dari permukaan media sampai dengan ujung tunas tertinggi pada 3 sampel eksplan, panjang tunas diamati 3 hari sekali selama 6 minggu pengamatan.
6. Panjang akar, diukur dari pangkal akar sampai dengan ujung akar pada 3 sampel eksplan, panjang tunas diamati 3 hari sekali selama 4 minggu pengamatan.
7. Panjang tunas terpanjang, memilih tunas terpanjang kemudian diukur, pada 3 sampel eksplan, panjang tunas diamati 3 hari sekali selama 6 minggu pengamatan.

8. Panjang akar terpanjang, memilih akar terpanjang kemudian diukur, pada 3 sampel eksplan, panjang tunas diamati 3 hari sekali selama 6 minggu pengamatan.

3.6 Analisis Data

Data yang diperoleh dianalisa dengan menggunakan metode splitplot yang disusun dengan menggunakan Rancangan Acak Kelompok (RAK) dengan uji F untuk mengetahui pengaruh dari perlakuan yang diberikan. Apabila pengaruh perlakuan nyata dilanjutkan dengan uji BNJ atau Tukey taraf α 5% untuk mengetahui pengaruh terbaik pada seluruh perlakuan. Pengolahan data menggunakan aplikasi Microsoft excel 2007.

